



Institut de Recherches sur le Caoutchouc
Membre de l'International Rubber Research and Development Board

*Centre de Recherches
CIRAD de Montpellier*

**ACCLIMATATION DES MICROBOUTURES
D'HEVEA BRASILIENSIS**

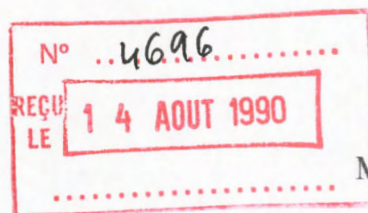
RAPPORT DE RECHERCHE
Christophe DRENOU

IRCA - COTE D'IVOIRE
Juillet 1990



Institut de Recherches sur le Caoutchouc
Membre de l'International Rubber Research and Development Board

Centre de Recherches
CIRAD de Montpellier



*- NICOLAS a un septième
- ESCURACH qui classe.*

Montpellier, 8 août 1990

N/Réf : MPC 90/00220

Monsieur CAMPAIGNOLLE
Directeur

IRCA-CIRAD
42, rue Scheffer
75116 PARIS CEDEX

Monsieur Le Directeur,

Je vous prie de trouver ci-joint le Rapport de Recherche rédigé par C. DRENOU au terme de son contrat à l'IRCA COTE D'IVOIRE.

C'est dans un souci d'économie que l'IRCA COTE D'IVOIRE m'a transmis l'original de ce rapport en me demandant de le faire dupliquer et de le diffuser aux destinataires

Vous pourrez, comme moi, constater la grande qualité de cette synthèse qui s'attache, sans longueurs inutiles, à transcrire toutes les informations importantes, d'ordre scientifique ou technique, recueillies lors de cette étude. Nous envisagerons, avec l'intéressé, en septembre prochain la possibilité d'en tirer une publication.

Comme le souligne C. DRENOU, l'objectif initial a bien été atteint puisque l'on dispose avec ce document non seulement d'une méthode d'acclimatation pour les vitroplants d'*Hevea* (fiche technique) mais aussi d'informations pour l'adapter à d'autres environnements ou pour approfondir certains axes de recherche.

Ce rapport sera repris, en fin d'année, dans le cadre du rapport annuel de la SMH.

Veuillez croire, Monsieur Le Directeur, à mes sentiments respectueux et dévoués.

M.-P. Carron
Responsable de la Culture *in vitro*

1. INTRODUCTION

2. LES CONDITIONS CLIMATIQUES

- 2.1. La sortie de tube
 - 2.1.1. Méthode de confinement
 - 2.1.2. Durée de confinement
 - 2.1.3. Intensité de l'ombrage
- 2.2. La reprise de croissance
- 2.3. Conclusion

3. L'ENRACINEMENT

- 3.1. Séquences d'induction et d'expression
- 3.2. Observations morphologiques
- 3.3. Conclusion

4. LA NUTRITION MINERALE

- 4.1. Les plants enracinés in-vitro
- 4.2. Les plants enracinés ex-vitro
- 4.3. Conclusion

5. LE SUBSTRAT

- 5.1. Substrat d'enracinement
- 5.2. Substrat de reprise de croissance
- 5.3. Conclusion

6. LE CONTENEUR

- 6.1. Les plateaux d'enracinement
- 6.2. Les conteneurs d'élevage
- 6.3. Conclusion

7. L'APPORT DE CO₂

- 7.1. Apport de 1800 ppm entre J0 et J42
- 7.2. Apport de 1800 ppm entre J42 et J72
- 7.3. Conclusion

8. CONCLUSION

9. BIBLIOGRAPHIE

Annexe 1 : Fiche technique

Annexe 2 : Méthode de calcul de la "densité réelle" d'un sol

ABREVIATIONS

3

J0 : jour de la sortie de tube
Jn : n jours après J0

UC : unité de croissance
UCn : nombre d'UC à Jn

H : hauteur (cm.)
Hn : hauteur à Jn

ME : masse d'eau
PS : poids sec

a,b,c,... : les résultats chiffrés suivis d'une ou de plusieurs lettres différentes sont significativement différents selon la méthode d'analyse de variance de Sheffe utilisée avec un risque de première espèce de 5%.

1. INTRODUCTION

4

Ce rapport de recherche est un complément apporté au bilan annuel 1989. Il exploite les résultats les plus marquants obtenus entre novembre 1988 et juillet 1990.

Parmi les 40 expériences mises en place au cours de cette période, 13 d'entre elles ont été retenues et regroupées en six thèmes de recherche :

- les conditions climatiques
- l'enracinement
- la nutrition minérale
- le substrat
- le conteneur
- l'apport de CO₂

Une fiche technique du procédé d'acclimatation est proposée en fin de rapport.

2. LES CONDITIONS CLIMATIQUES

De nombreux travaux ont montré que les plants multipliés in-vitro présentent à la sortie de tube une anatomie foliaire très modifiée : le parenchyme palissadique est réduit, le mésophylle est constitué de cellules séparées par de larges lacunes, la cuticule est très peu développée, les chloroplastes sont atrophiés et les stomates souvent non fonctionnels (4.26).

Cette structure anatomique défectueuse a pour conséquences :

- une rapide perte en eau au cours du transfert : la fermeture des stomates en présence d'une faible humidité relative, alors qu'elle est quasi-instantanée chez les feuilles formées ex-vitro, est très lente dans le cas des feuilles in-vitro (> à 15 min) (3.20)
- une activité photosynthétique réduite (18).

La récupération progressive au cours de l'acclimatation des caractéristiques morphologiques et physiologiques nécessaires au bon état hydrique et à l'autotrophie des vitro-plants implique le contrôle de plusieurs paramètres climatiques :

- l'humidité relative
- la température
- la lumière

Quatre expériences principales nous ont permis d'établir une séquence climatique allant de la sortie de tube jusqu'au passage en pépinière des microboutures d'hévéa.

2.1. LA SORTIE DE TUBE

2.1.1. Méthode de confinement

2.1.1.1. Matériels et méthodes

* **Matériel** : microboutures d'hévéa, seedling, expédiées de Montpellier à racines nues sans gélose.

* **Traitements** : deux types d'enceintes permettant d'obtenir une atmosphère confinée sont étudiées :

- la serre châssis à parois de fim plastique transparent doublé à l'extérieur par une toile blanche en fibres synthétiques non tissées (type P30)
- le tunnel en toile P30.

Chaque traitement comprend 30 plants.

*** Conditions expérimentales :**

- substrat : 80% tourbe + 20% sable fin
- conteneur : fertil-pots 5x9 cm., à parois de tourbe compressée jusqu'à J30, puis sacs polyéthylène de 5l.
- fertilisation : aucun apport pendant la période de confinement, puis utilisation de PLANTPROD 20-20-20, 1g./l., 100ml. /plant /semaine.
- brumisation intermittente (3x10 min./h. entre 9h. et 17h.)
- nappe d'arrosage (AQUANAP) imbibée d'eau
- durée de confinement : 30 j. depuis la sortie de tube
- durée de l'expérience : de la sortie de tube (J0) jusqu'à la fin de la période d'acclimatation (J90).

*** Observations :** les taux de survie ainsi que les mesures individuelles des hauteurs ont été notés pour l'ensemble des plants. Les paramètres climatiques de chaque traitement ont été enregistrés.

2.1.1.2. Résultats

A la fin de l'acclimatation, les meilleurs résultats ont été trouvés avec la méthode de confinement utilisant les tunnels en toile P30 (Tab. 1).

L'augmentation du taux de survie obtenue avec cette méthode est liée à :

- une élévation moindre de la température
- un niveau d'éclairement plus important
- une humidité relative supérieure
- un renouvellement de l'atmosphère du tunnel.

2.1.2. Durée de confinement

2.1.2.1. Matériels et méthodes

*** Matériel :** microboutures d'hévéa, seedling, expédiées de Montpellier sans racine, piquées dans de la gélose.

*** Traitements :** trois durées de confinement depuis la sortie de tube sont étudiées : 20j., 30j., et 40j. Il y a 30 plants par traitement.

*** Conditions expérimentales :**

- méthode de confinement : tunnel en toile P30 avec 75% d'ombrage, une brumisation intermittente (3x10 min/h.) et une AQUANAP
- substrat : 80% tourbe + 20% sable de J0 à J40, puis terre végétale de surface
- conteneur : fertil-pots 5 x 9 cm. jusqu'à J40 puis sacs polyéthylène de 3l.

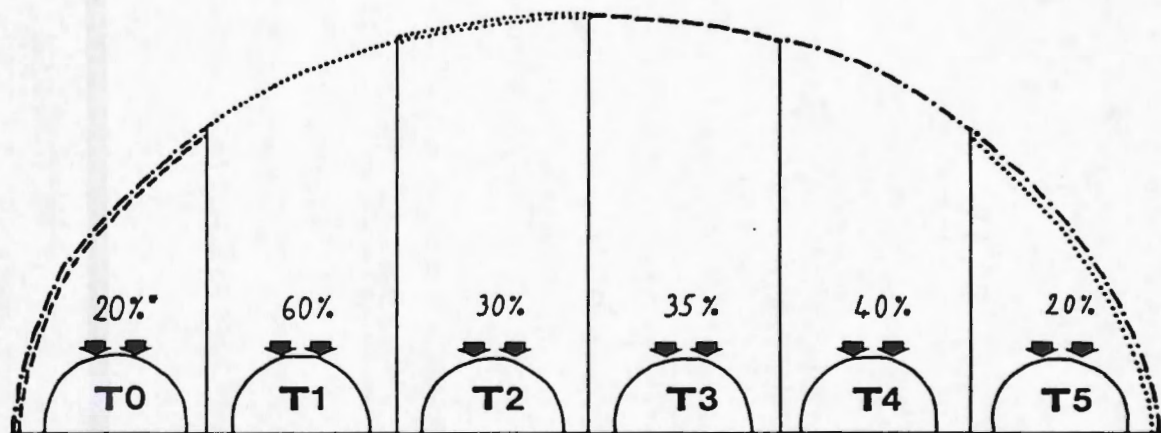
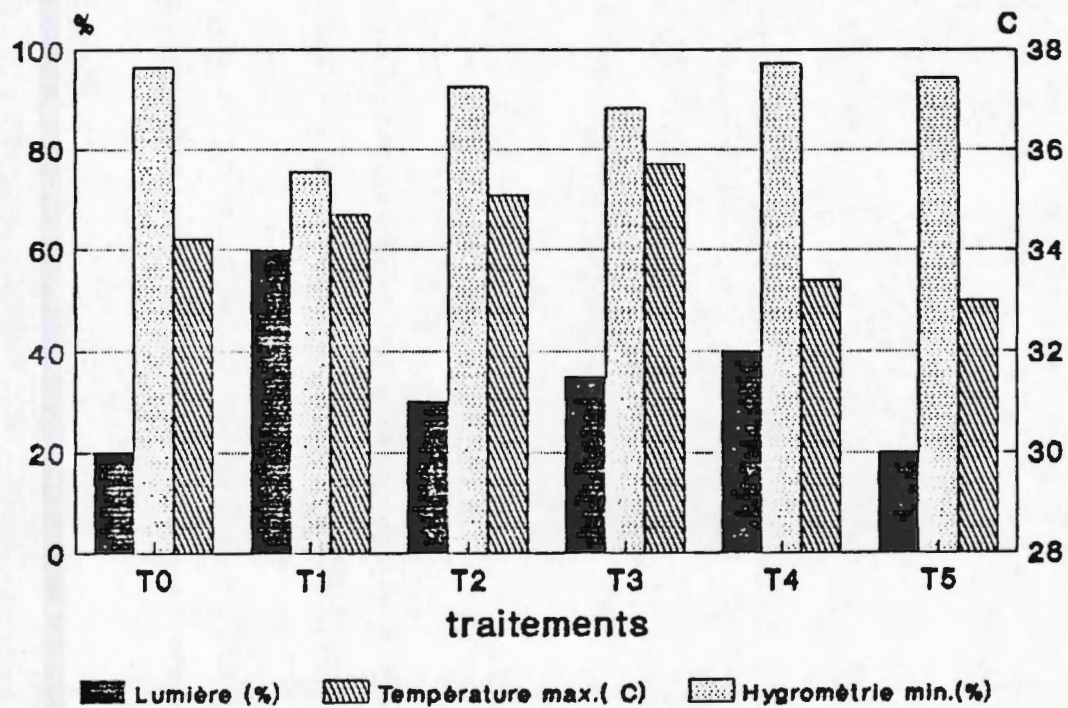
Tableau 1 Méthode de confinement

Traitement	Conditions climatiques			% de survie		Hauteur à J90
	L	T	H	J30	J90	
Serre-châssis en toile plastique	360	38	82	74.5	54.2	3.0 a
Tunnel en toile P30	440	33	93	93.1	77.5	3.5 a

Mesures réalisées le 15 et 19 avril 1988 à 14h., ciel dégagé :

- L : lumière reçue par les feuilles en $\mu \text{ mole.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$,
- T : température maximale ($^{\circ}\text{C}$),
- H : humidité relative minimale (%).

Fig.1 Les conditions climatiques



Légende : Toile P 30 (blanche)
 ----- Ombrière } (noir)
 - - - - - Brise-vent }
 * Flux de photons photosynthétiques transmis, en % de la lumière incidente.

- fertilisation : aucun apport jusqu'à J40 puis 0.5 g./l. de PLANTPROD à raison de 100 ml./sac/semaine
- durée de l'expérience : de J0 à l'émission d'une première UC ex-vitro (J56)

2.1.2.2. Résultats

Un passage en milieu confiné trop bref (20 j.) fait chuter le taux de réussite de l'acclimatation des microboutures (53.3 %). Les temps de confinement de 30 j. et de 40 j. donnent des résultats identiques (76.6 %).

2.1.3. Intensité de l'ombrage

2.1.3.1. Matériels et méthodes

* Matériel : microboutures d'hévéa, seedling, expédiées de Montpellier sans racine, piquées dans de la gélose.

* Traitements : les tunnels de confinement en toile P30 brumisés extérieurement par intermittence (3x10 min./h.) entre 9h. et 17h. sont placés sous 6 toiles d'ombrage différent (Fig. 1). Chaque traitement comprend 45 plants.

* Conditions expérimentales :

- substrat : 80% tourbe + 20% perlite
- conteneur : fertil-pots 5x9 cm.
- fertilisation : aucun apport
- durée de l'expérience : 37 j. depuis la sortie de tube

2.1.3.2. Résultats

Cette expérience fait intervenir trois variables :

- la lumière
- l'humidité relative
- la température

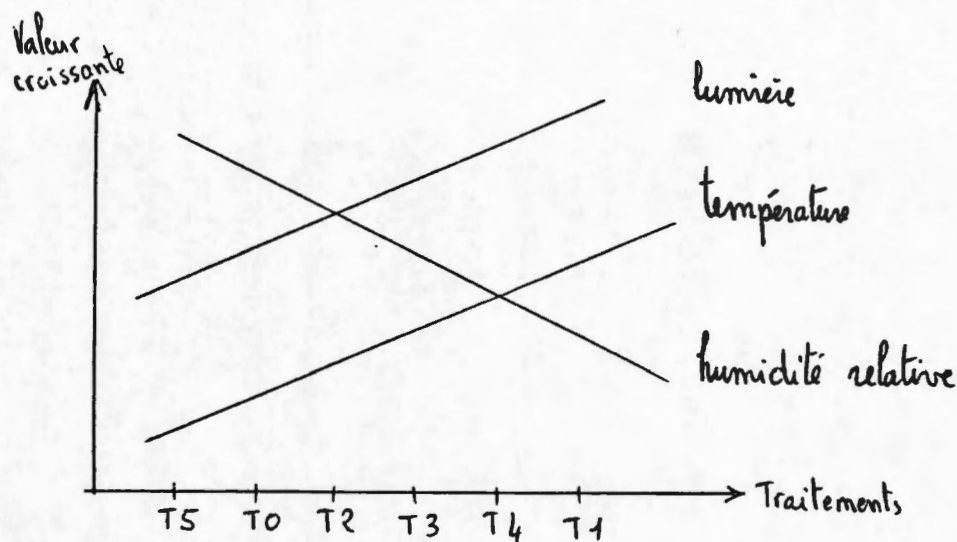
Nous avons enregistré une tendance générale (à l'exception du traitement T4) de baisse de l'humidité relative et de hausse de la température dans le cas d'une diminution de l'intensité de l'ombrage. L'élévation de la température est moindre si la toile est blanche. Ces observations sont résumées sur le schéma théorique suivant.

Tableau 2 Intensité de l'ombrage

Traitement	Conditions climatiques			Résultats après 37 j. de confinement		
	L	T	H	mortalité (%)	ΔH	ΔUC
T0	267	34.2	96.2	0	0.30 bc	0.36 ab
T1	801	34.7	75.5	10.8	0.49 a	0.43 a
T2	391	35.1	92.5	11.3	0.21 c	0.30 bc
T3	467	35.7	88.3	15.2	0.24 bc	0.23 c
T4	578	33.4	97.2	4.4	0.37 ab	0.37 ab
T5	266	33.0	94.1	11.1	0.23 c	0.42 ab

Mesures réalisées entre le 27.09.89 et le 26.10.89 :

- L : lumière arrivant sur les tunnels en P30 à 12h., en $\mu \text{ mole.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
- T : température maximale ($^{\circ}\text{C}$)
- H : humidité relative à 12h. (%)
- ΔH : accroissement en hauteur (cm.)
- ΔUC : accroissement en nombre d'UC



Les résultats de cette expérience mettent en évidence plusieurs points (Tab. 2) :

- influence négative des températures supérieures à 35°C au cours de la période de confinement : les traitements T2 et T3 ont les plus faibles accroissements en hauteur et en nombre d'UC,
- influence positive d'une augmentation de l'éclairage : le traitement T1 (toile d'ombrage en P30) donne le meilleur accroissement en hauteur des plantules,
- importance du compromis entre les facteurs lumière, température et humidité relative : le traitement T4 (brise-vent NORTENE) est la meilleure combinaison entre ces trois paramètres, ses résultats sont comparables à ceux de T1 mais son humidité relative plus élevée fait baisser son taux de mortalité.

Notons que cette expérience a été réalisée pendant la saison des pluies d'octobre et novembre. En saison sèche, les différences observées entre les valeurs de l'humidité relative des différents traitements seraient vraisemblablement accentuées. Il est donc prudent de conserver une toile d'ombrage de 60 % (brise-vent NORTENE) au dessus des tunnels de confinement pendant les 30 premiers jours de l'acclimatation correspondant à la période d'enracinement des microboutures. Cette toile régulant les trois paramètres climatiques analysés précédemment, a aussi un rôle de brise-vent autorisant une brumisation constamment localisée au dessus des tunnels.

2.2. LA REPRISE DE CROISSANCE

2.2.1. Matériels et méthodes

* **Matériel** : microboutures d'hévéa, seedling, expédiées de Montpellier sans racine, piquées dans de la gélose.

* Traitements : après la phase d'enracinement réalisée sous des tunnels de confinement en toile P30 placés sous 6 toiles d'ombrage différent (selon le dispositif et les appellations de l'expérience précédente), la toile P30 des tunnels est retirée. Les microboutures enracinées sont alors brumisées par intermittence (3x 10 min/h.) par une rampe de brumisation placée sous la toile d'ombrage caractérisant chaque traitement. Chaque traitement comprend 40 plants.

* Conditions expérimentales :

- substrat : terre végétale de surface
- conteneur : sacs polyéthylène de 5 l.
- fertilisation : 1 g/l. de PLANTPROD 20-20-20, 100ml/sac/semaine
- durée de l'expérience : de la fin de la phase d'enracinement (J37) à la fin de l'endurcissement en serre d'acclimatation (J64).

2.2.2. Résultats

Tout comme l'expérience précédente, c'est le traitement recevant le plus de lumière qui présente le meilleur accroissement en hauteur et en nombre d'unités de croissance (Tab.3). L'augmentation de la température au delà de 35°C et la baisse de l'humidité relative (<80%) correspondant à ce traitement n'ont pas de conséquences négatives sur le taux de reprise de croissance après la phase d'enracinement.

L'éclairement maximum testé au cours de cette expérience est une limite supérieure : placer les microboutures sous aucune toile d'ombrage provoque des jaunissements et des brûlures du feuillage (observations personnelles).

La toile en fibres non tissées P30 procure donc un ombrage nécessaire et suffisant qui protège les plantes tout en stimulant leur croissance. Une variante de ce traitement consiste à disposer la toile P30 non pas au dessus de la rampe de brumisation, mais juste en dessous : l'eau brumisée humidifie alors la toile sans ruisseler sur le feuillage des plantes. Cette méthode permet d'abaisser la température enregistrée sous le P30 et d'éviter tout risque de brûlure sur le feuillage. Par prudence la brumisation continue est conseillée entre 9h. et 17h., surtout en période d'harmattan.

Tableau 3 Reprise de croissance

Traitements	Intensité de l'ombrage (%)	Reprise de croissance entre J37 et J64 (%)	ΔH	ΔUC
T0	80	78	0.56 c	0.62 c
T1	40	78	0.97 a	0.95 a
T2	70	64	0.97 a	0.76 b
T3	65	64	0.74 b	0.70 b
T4	60	79	0.68 bc	0.70 b
T5	80	67	0.60 c	0.79 b

ΔH : accroissement en hauteur (cm.) entre J37 et J64

ΔUC : accroissement en nombre d'UC entre J37 et J64

2.3. CONCLUSION

Les résultats de ces expériences nous ont conduit vers une décomposition du processus d'acclimatation en quatre phases. Des variations de notre schéma d'acclimatation utilisé en Côte d'Ivoire ne sont pas à exclure, mais plusieurs conditions climatiques doivent être remplies. Trois priorités en particulier sont à respecter :

- placer les microboutures dès la sortie de tube en milieu confiné pendant au moins 30 jours,
- stimuler la reprise de croissance en abaissant l'intensité de l'ombrage,
- adapter les protections climatiques au pays d'accueil des microboutures et aux différentes saisons de l'année.

Les conditions climatiques des quatre phases de l'acclimatation sont regroupées dans le tableau suivant.

Phases	Durée	Abri	Brumisat.	L	T	H
Enracinement	28j.	ombrage 60%+P30	3x10min/h.	500<L<800	<35	>90
Reprise de croissance	28j.	P30	continue	900<L<2000	<35	>80
Endurcissement	28j.	ombrage 60%	manuelle	800<L<1500	<37	>50
Elevage	>36j.	supprimé	supprimée	extérieur	ext.	ext.

L : lumière en $\mu \text{mole.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ mesurée à 12h. (recommandations estimées)
T : température ($^{\circ}\text{C}$)
H : humidité relative (%)

3. L'ENRACINEMENT

L'alimentation hydrique et minérale des plantules sorties de tube dépend étroitement de la vascularisation de la zone de liaison entre la racine et la tige, et de l'état fonctionnel du système racinaire (13).

L'enracinement des vitro-plants peut être envisagé selon deux séquences principales :

- induction et apparition des premières racines in-vitro,
- induction in-vitro puis élongation racinaire réalisée entièrement ex-vitro.

Certains auteurs donnent des arguments contre l'enracinement initié in-vitro (7,8,19) :

- manutention importante et augmentation du coût de production,
- état non fonctionnel des racines formées in-vitro après le transfert ex-vitro,
- risques de maladies (Pythium, Fusarium) dus à l'endommagement des racines in-vitro au cours du transfert.

L'objectif principal de nos travaux a été de comparer les deux méthodes d'enracinement afin de choisir la plus performante vis à vis de :

- l'architecture (géotropisme),
- l'état physiologique des racines.

3.1. SEQUENCES D'INDUCTION ET D'EXPRESSION

3.1.1. Matériels et méthodes

* Matériel : microboutures d'hévéa, seedling, issues de recyclages primaires.

* Traitements : plusieurs lots de microboutures enracinées in-vitro sur différents milieux (gélose, laine de roche) ont été comparés à des microboutures reçues sans racine en Côte d'Ivoire. Dans le premier cas, les plantules sont expédiées 21 jours après l'induction racinaire, dans le second, l'expédition a lieu 3 à 5 jours après l'induction (Tab. 4). Chaque traitement comprend 60 plants.

* Conditions expérimentales :

- substrat : 80% tourbe + 20% perlite pendant 30 jours, puis 100% terre de plantation
- conteneur : ferti-pots 5x9 cm à parois de tourbe compressée pendant 30 jours, puis repotage dans des sacs de 5 litres
- fertilisation : aucun apport pendant la période de confinement (30 premiers jours), puis utilisation de PLANTPROD 20-20-20 2g./l., 100 ml./plant/semaine

Tableau 4. ENRACINEMENT DES MICROBOUTURES

	Taux de survie	Racines primaires				Racines secondaires poids sec (g)
		Nb	Longueur (cm)	Diamètre (mm)	Poids sec (g)	
Induction et élongation <u>IN-VITRO</u>						
T0. expédition des microboutures 2lj après l'induction, sur mottes en laine de roche	86,1	1,9ab	10,84a	0,96b	0,04a	0,01b
T1. expédition 2lj après l'induction, racines nues	86,7	1,4bc	6,62b	0,99b	0,02b	0,01b
T2. expédition 2lj après l'induction, sur gélose	95,8	1,1c	9,83ab	0,91b	0,02b	0,01b
Induction <u>IN-VITRO</u> et élongation <u>EX-VITRO</u>						
T3. expédition 5j après l'induction, sur gélose	94,4	2,4 a	13,74a	1,45a	0,04a	0,02a

- Ces résultats ont été obtenus après 3 mois d'acclimatation.

- a, b, c, ... les résultats présentant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents.

- durée de l'expérience : 3 mois depuis la sortie de tube.

* Observations : Le diamètre et la longueur des tiges ont été mesurés pour l'ensemble des plants, les poids secs des systèmes aériens et racinaires sur dix individus par traitement.

3.1.2. Résultats

Peu de différences significatives sont à signaler en ce qui concerne le système aérien après trois mois d'acclimatation (Fig. 2).

Au niveau du système racinaire (Tab. 4), ce sont les microboutures expédiées de Montpellier sans racine qui présentent les meilleurs résultats :

- nombre de racines primaires plus élevé,
- longueur et diamètre des pivots plus importants,
- poids secs des racines (et en particulier les racines secondaires) supérieurs.

3.2. OBSERVATIONS MORPHOLOGIQUES

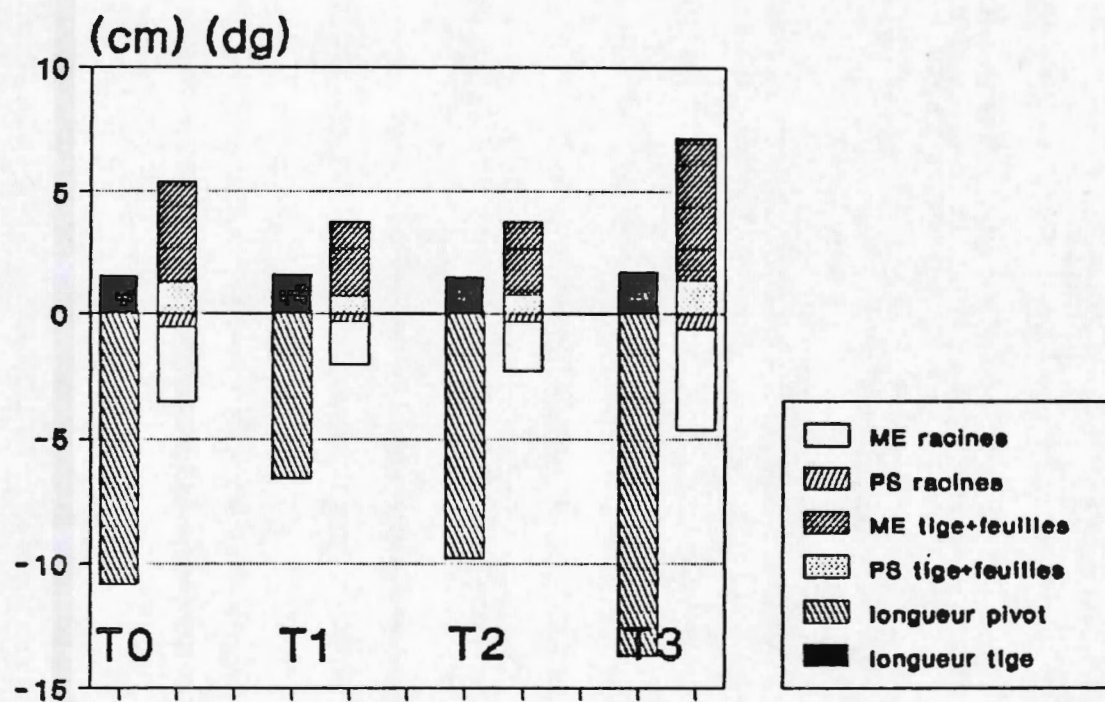
Indépendamment du substrat et du conteneur utilisés au cours de l'acclimatation, l'étude descriptive des systèmes racinaires de microboutures (seedling) nous a permis de montrer :

- d'une part que l'architecture des racines formées in-vitro présente dans de nombreux cas des perturbations importantes (Fig. 3 et 5),
- d'autre part que ces racines sont partiellement ou entièrement remplacées par de nouvelles racines apparues ex-vitro (Fig.5).

Contrairement aux racines dont l'élongation a commencé dans le tube, les racines ex-vitro sont très bien différenciées : elles présentent un pivot racinaire de gros diamètre et très orthotrope portant de nombreuses racines secondaires (Fig.4).

Notons enfin que l'apport d'engrais (voir chapitre "La nutrition minérale" de ce rapport) est inefficace tant que les premières racines formées ex-vitro ne sont pas apparues, ce qui laisse supposer un état fonctionnel des racines in-vitro très insatisfaisant.

Fig.2 Enracinement des microboutures



Résultats après 3 mois d'acclimatation

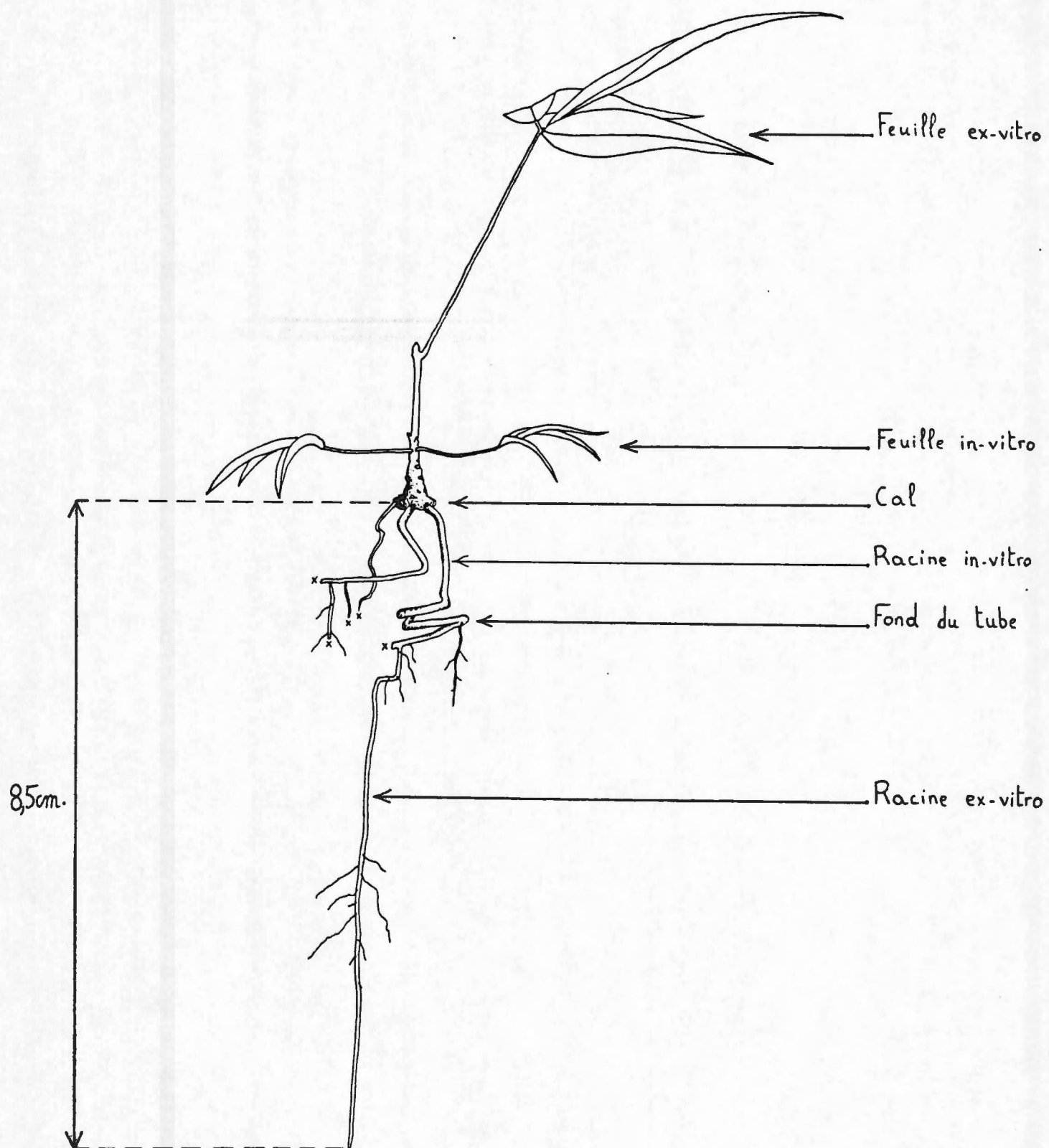


FIG.3 ENRACINEMENT INITIE IN-VITRO
(Après 70j d'acclimatation)

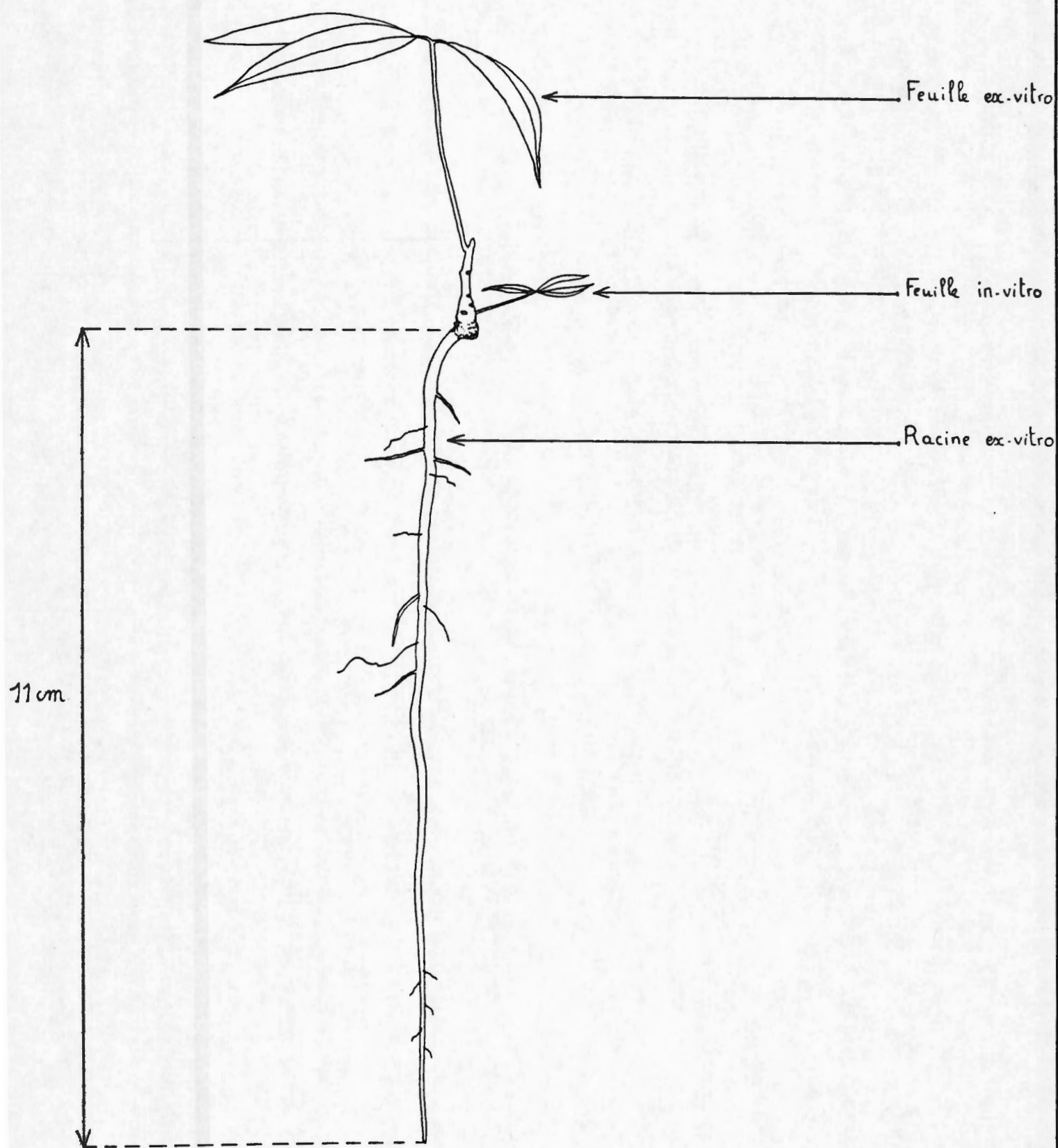
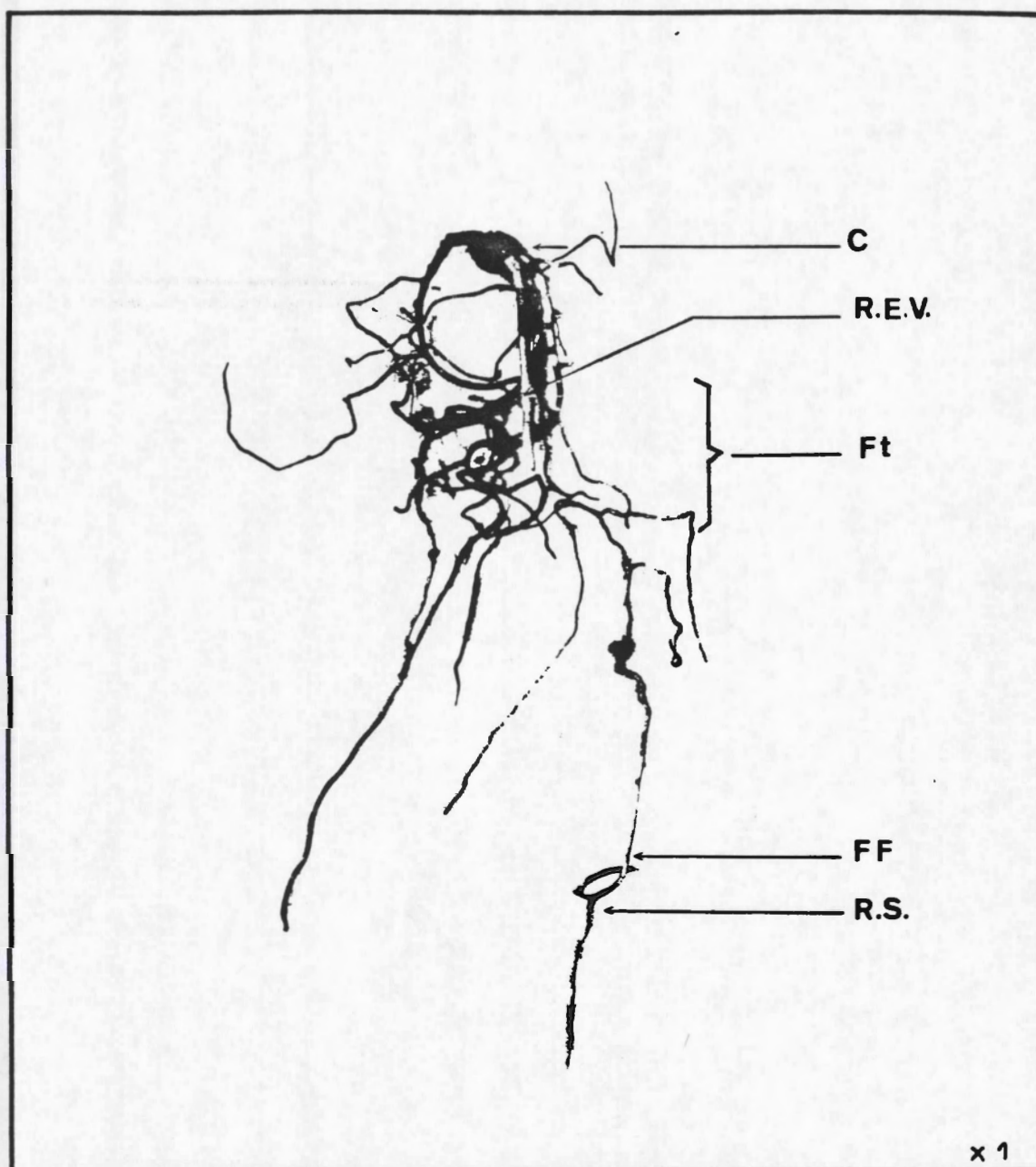


FIG.4 ENRACINEMENT INITIE EX-VITRO
(Après 70j d'acclimatation)

Fig. 5 - Enracinement initié in-vitro
(Après 65 j. d'acclimatation)



Légende : C : cal
F.t : Fond du tube
F.F. : Fond du fertil-pot
R.e.v. : Racine ex-vitro
R.S. : Relai sympodial

3.3. CONCLUSION

La qualité du système racinaire est meilleure si le développement des racines se fait in-vivo plutôt qu'in-vitro : l'architecture des racines initiées au cours de l'acclimatation est comparable à celle des plants issus de graines.

Les microboutures sont expédiées piquées sur la gélose des tubes. A la réception, le repiquage dans un substrat horticole est une opération rapide : trois personnes peuvent repiquer 1000 plantules en 2h., alors qu'il faut 5h. dans le cas des microboutures enracinées in-vitro sur des cubes en laine de roche.

L'enracinement se fait au cours des 28 premiers jours après la sortie de tube, et son taux est compris entre 70 et 80%.

4. NUTRITION MINERALE

La fertilisation des vitro-plants au cours de la réinsertion in-vivo est un sujet peu abordé dans la bibliographie. Certains auteurs préconisent un niveau bas ou une absence de nutrition minérale dans le substrat pendant 20 jours après le transfert ex-vitro (14.22).

Nos travaux ont tenté de répondre à deux questions :

- les microboutures d'hévéa ont-elles besoin d'une nutrition minérale au cours de l'acclimatation?
- si oui : quelles sont les doses d'engrais à apporter?

4.1. LES PLANTS ENRACINES IN-VITRO

4.1.1. Matériels et méthodes

* Matériel : microboutures d'hévéa, seedling, expédiées de Montpellier enracinées in-vitro sur micro-mottes en laine de roche GRODAN.

* Traitements : un lot de plantules reçoit de l'eau sans engrais, un deuxième est arrosé par une solution de COMPLESAL M apportant 6 mg. d'azote par plant et par semaine dès la sortie de tube. Chaque traitement comprend 30 plants.

* Conditions expérimentales :

- substrat : 80% tourbe + 20% perlite
- conteneur : fertil-pots 5x9 cm. à parois de tourbe compressée
- méthode de confinement : serre châssis à parois de film plastique transparent doublé à l'extérieur par une toile blanche en fibres synthétiques non tissées (P30)
- durée de l'expérience : 28 jours depuis la sortie de tube

4.1.2. Résultats

L'apport de solutions minérales, même diluées, est néfaste pendant le confinement des microboutures enracinées in-vitro. Cela affecte nettement le taux de survie et le développement tant aérien que souterrain qui est deux fois plus faible (Fig.6).

Les observations morphologiques des systèmes racinaires ont mis en évidence :

- des racines courtes, peu différenciées et à géotropisme indéfini dans le cas des plants ayant reçus de l'engrais,
- des racines longues et fortement orthotropes dans le cas d'une absence de fertilisation.

4.2. LES PLANTS ENRACINES EX-VITRO

4.2.1. Matériels et méthodes

* Matériel : microboutures d'hévéa, seedling, expédiées de Montpellier sans racine.

* Traitements : après la phase d'enracinement réalisée en milieu confiné pendant 30 jours sans engrais, une comparaison est effectuée entre un lot de microboutures recevant de l'azote (COMPLESAL M, 6 mg. d'azote par plant et par semaine) dès le trentième jour, et un lot restant sans apport d'engrais jusqu'à J40.

A partir de J40, les deux lots reçoivent la même dose d'azote (10 mg./plant/semaine avec du PLANTPROD 20.20.20.)

Chaque traitement comprend 30 plants.

* Conditions expérimentales :

- substrat : 80% tourbe + 20% sable jusqu'à J40, puis 100% de terre végétale de surface
- conteneur : fertil-pots 5x9 cm. jusqu'à J40, puis utilisation de sacs polyéthylènes de 5 l.
- méthode de confinement : tunnel en toile P30 + 60% d'ombrage et une brumisation intermittente (3x10 min/h.)
- durée de l'expérience : 55 jours depuis la sortie de tube.

4.2.2. Résultats

Une fertilisation azotée effectuée sur des microboutures enracinées ex-vitro stimule la reprise de croissance (UC) et le nombre de feuilles formées. Cette stimulation s'accompagne cependant d'une augmentation du taux de mortalité (Tab.5).

4.3. CONCLUSION

Les résultats précédents semblent contradictoires :

- l'apport d'engrais (dès J0) est néfaste sur des plantules enracinées in-vitro
- il est efficace sur des plantules enracinées in-vivo après un délai d'enracinement d'environ 30 jours.

Il a été cependant démontré que le système racinaire formé dans le tube est partiellement ou entièrement remplacé par de nouvelles racines apparaissant au cours de l'acclimatation (voir chapitre "l'enracinement" de ce rapport). Il semble donc que les racines développées in-vitro ne sont pas fonctionnelles : les microboutures ne répondent favorablement à l'apport d'engrais qu'après avoir formé des racines in-vivo.

Remarque : des résultats complémentaires ont été obtenus par A. LECONTE. Ils portent sur :

- la date optimale du premier apport : elle correspond à la fin de la phase d'enracinement (confirmation de nos résultats),
- la fréquence d'apport et la dose : 10 mg. d'azote/plant/semaine sont préconisés jusqu'à J70.

**Fig.6 Nutrition minérale
Plants enracinés in-vitro**

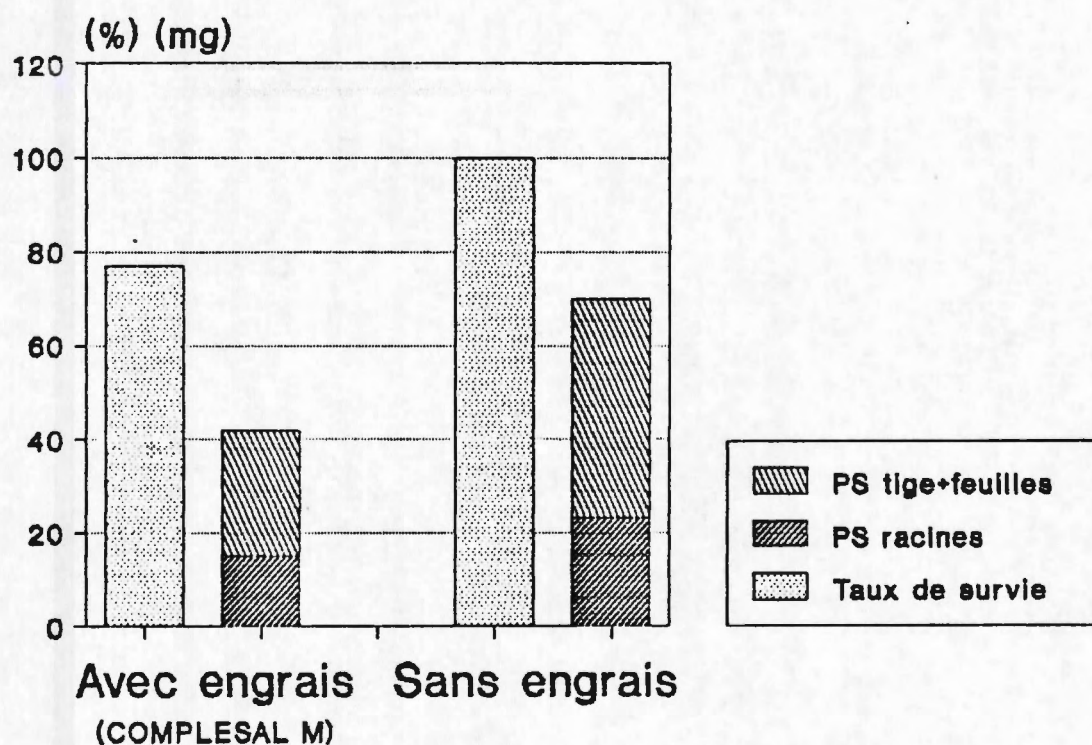


Tableau 5 Nutrition minérale sur plants enracinés ex-vitro

Date du premier apport d'engrais	% de survie à J55	Accroissement à J55 en UC en H (cm)		Nb de feuilles ex-vitro
J30	63.3	1.06 a	1.24 a	1.63 a
J40	76.6	0.60 b	0.97 a	0.91 b

5. LE SUBSTRAT

La composition des substrats utilisés en acclimatation de vitro-plants est en général constituée de composants organiques peu fermentescibles (tourbe, écorce de pin, fibres de coco) associés à des éléments minéraux plus ou moins grossiers améliorant le drainage (vermiculite, perlite, sable, pouzzolane) (2.11.12.23).

Les principales caractéristiques pédologiques recherchées sont:

- une absence de pathogènes,
- une bonne disponibilité en eau,
- une teneur en air favorable au développement racinaire,
- une réserve importante en éléments nutritifs assimilables par la plante.

5.1. SUBSTRAT D'ENRACINEMENT

5.1.1. Matériels et méthodes

* Matériel : microboutures d'hévéa, seedling, expédiées de Montpellier sans racine, 5 jours après l'induction racinaire.

* Traitements : six substrats ont été étudiés.

- tourbe 80% + sable 20%
- tourbe 100%
- sable 100%
- mottes en laine de roche GRODAN
- perlite 100%
- vermiculite 100%

* Conditions expérimentales :

- conteneur : plateaux alvéolés en polystyrène (alvéole de 2.4x2.4x 4 cm.)
- méthode de confinement : tunnel en toile P30 brumisé extérieurement (3x10 min/h.) sous une toile d'ombrage à 60%
- durée de l'expérience : 20 j. depuis la sortie de tube

5.1.2. Résultats

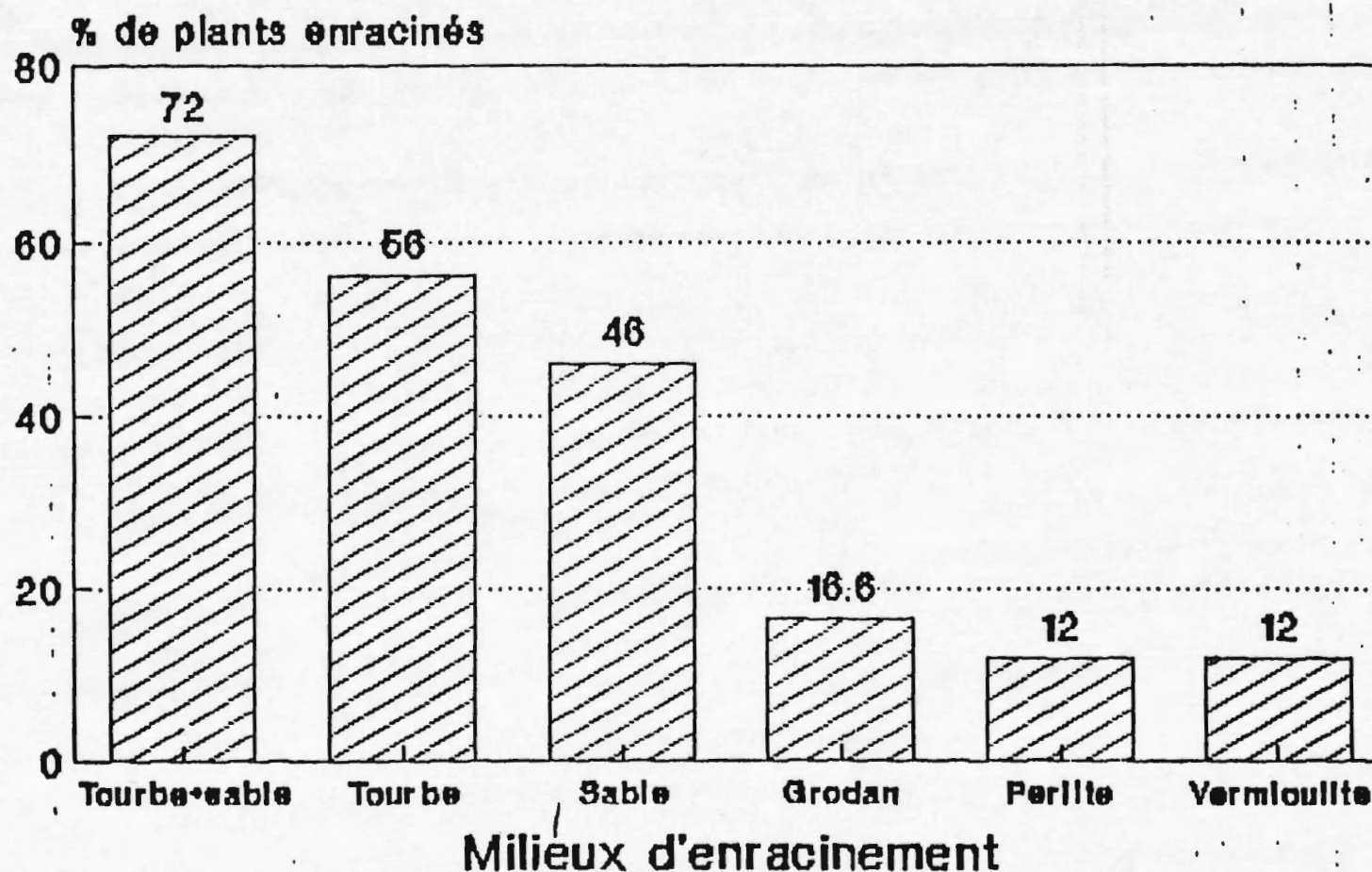
Le mélange composé de 80% tourbe + 20% sable est le substrat le plus adapté à l'enracinement des microboutures (Fig.7).

Ce résultat est sans doute à relier aux propriétés physiques des substrats (voir expérience suivante).

FIG. 7

MILIEU D'ENRACINEMENT

Résultats après 20j. d'acclimatation



5.2. SUBSTRAT DE REPRISE DE CROISSANCE ET D'ENDURCISSEMENT

5.2.1. Matériels et méthodes

* **Matériel** : microboutures d'hévéa, seedling, expédiées de Montpellier sans racine.

* **Traitements** : 9 substrats ont été étudiés.

- T0 : terre végétale de surface 100%
- T1 : tourbe blonde FLORA 100%
- T2 : tourbe 80% + sable 20%
- T3 : tourbe 60% + sable 40%
- T4 : tourbe 80% + perlite 20%
- T5 : tourbe 60% + perlite 40%
- T6 : tourbe 80% + terre 20%
- T7 : tourbe 60% + terre 40%
- T8 : tourbe 50% + terre 50%

* **Conditions expérimentales** :

La phase d'enracinement des microboutures est réalisée en milieu confiné (tunnels en toile P30 + 60% d'ombrage et brumisation extérieure) sur plateaux alvéolés contenant un mélange de tourbe 80% + sable 20%.

Après cette phase de 21 jours, les plants enracinés sont repiqués dans des sacs de 350 ml. fabriqués en toile non tissée NORDLYS 4133 et remplis des différents substrats étudiés.

La phase de reprise de croissance a lieu sous tunnels P30 ouverts sur les côtés et sous brumisation continue en l'absence de toile d'ombrage.

La phase d'endurcissement débute à J56. Elle a lieu à l'extérieur des tunnels P30 sous ombrière (60%) en l'absence de brumisation.

Fertilisation : apport de PLANTPROD 20.20.20. 1g./l., 25 ml./plant, deux fois par semaine à partir du repiquage des microboutures enracinées.

Chaque traitement comprend 35 plants.

* **Analyse des substrats** :

Le calcul des densités réelles (selon le protocole en annexes) nous a permis de déterminer en % du volume, les quantités de matière sèche, d'eau totale et d'air au point de ressuyage des 9 mélanges étudiés.

L'estimation de l'eau disponible a été réalisée en pesant la masse d'eau retenue par les substrats au point de flétrissement.

Les pH proviennent des analyses faites à Montpellier (laboratoire de P. Fallavier).

5.2.2. Résultats

* Caractéristiques des substrats :

La présence d'éléments fins (sable ou terre sablo-argileuse) dans le substrat abaisse sensiblement la teneur en air au stade de la capacité de rétention en eau. La perlite, au contraire, a un pouvoir d'aération du substrat important qui facilite l'utilisation de l'eau par la plante (Tab.6 et Fig.8).

La tourbe blonde, de très faible densité, a une porosité totale (eau + air) démesurément élevée : un mélange à base de tourbe pure a une quantité de matière sèche très faible qui, de plus, se dégrade très lentement. Il est donc très pauvre en éléments nutritifs directement assimilables par la plante.

Les mélanges les plus acides (pH<5) sont composés de tourbe ajoutée à un matériau d'origine minérale neutre tel que la perlite.

* Résultats et discussion (Tab. 7) :

La tourbe et la terre sont les deux composés organiques de l'expérience. Leurs caractéristiques sont opposées, mais ni l'un ni l'autre donne des résultats satisfaisants lorsqu'ils sont utilisés seuls : la terre est asphyxiante, la tourbe est trop pauvre en éléments nutritifs directement assimilables.

L'apport de sable ou de perlite chimiquement neutres à la tourbe n'augmente pas la richesse en éléments minéraux disponibles pour la plante.

Ajouter du sable à la terre déjà très sableuse (80% de sable) a pour effet de diminuer la porosité et donc de rendre le substrat encore plus asphyxiant.

Incorporer de la perlite à la terre (expérience ne figurant pas dans ce rapport), c'est aérer le substrat au détriment de l'eau totale retenue.

La solution, permettant à la fois d'améliorer les caractères physiques de la terre et les propriétés chimiques de la tourbe, semble être de mélanger ces deux matériaux. Le meilleur traitement de l'expérience est : 50% tourbe + 50% terre.

* Remarque :

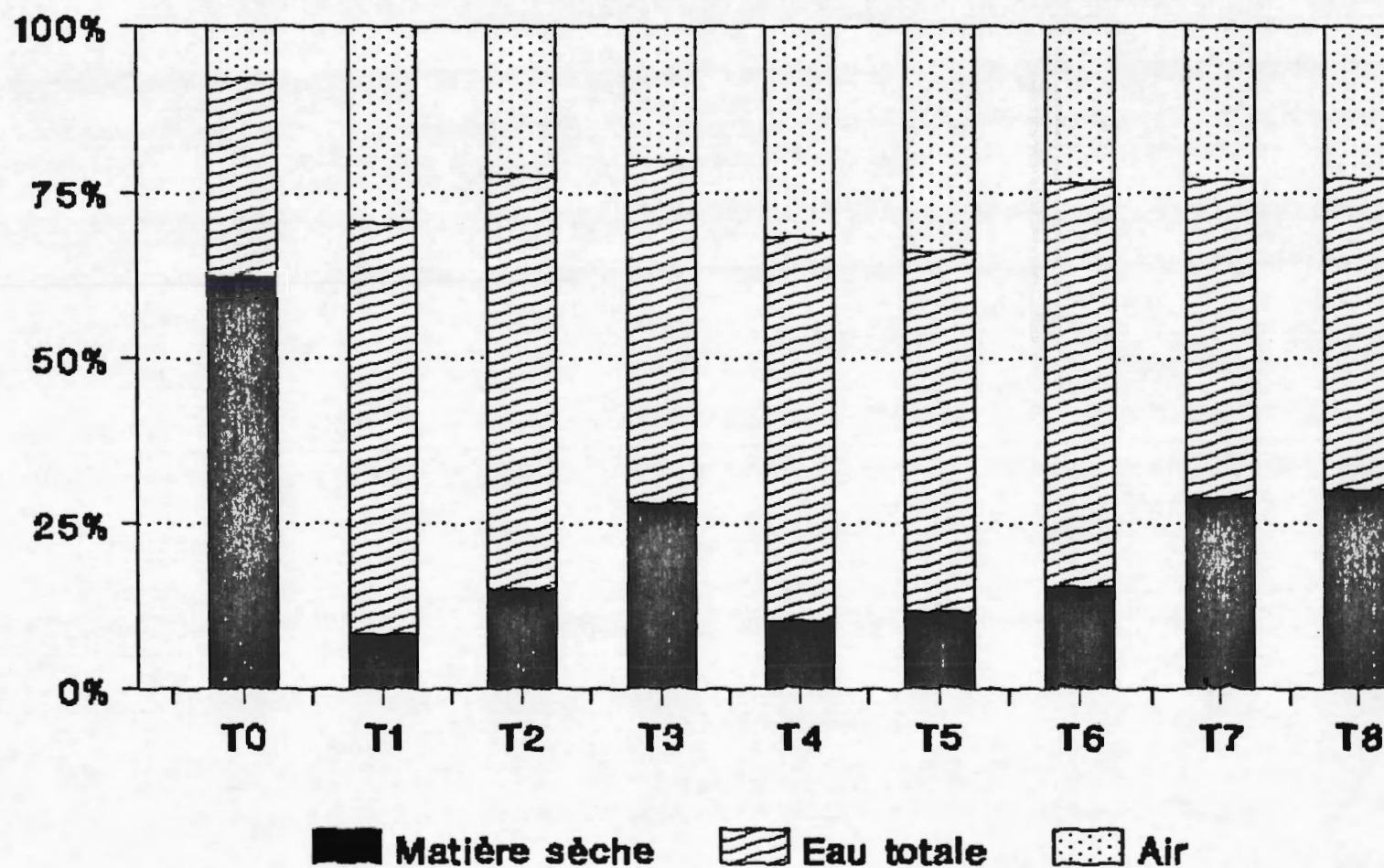
Une expérience complémentaire a repris le mélange 50% tourbe + 50% terre pour le comparer au cours de la phase d'enracinement avec le substrat standard : 80% tourbe + 20% sable. Aucune différence n'est à signaler entre ces deux traitements (66.6% d'enracinement à J22 dans le premier cas, 61.4 dans le second).

Tab. 6 - CARACTERISTIQUES DES SUBSTRATS -

Traitements	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Composition (%)	100 T	100 t	80t+20s	60t+40s	80t+20p	60t+40p	80t+20T	60t+40T	50t+50T
Densité réelle	2.64	1.40	2.44	2.54	1.05	0.93	2.20	2.36	2.37
pH extrait 1/5	6.15	4.15	5.35	5.65	4.45	4.55	5.05	5.45	5.60
Porosité (% vol.)	37.5	91.6	84.9	71.9	89.6	88.4	84.5	70.9	69.8
Mat. sèche (% vol.)	62.5	8.4	15.1	28.1	10.4	11.6	15.5	29.1	30.2
Eau totale (% vol.)	29.8	62.0	62.5	51.8	57.9	54.6	60.9	47.9	47.0
Eau disponible (% vol)	24.6	57.7	59.1	49.6	55.6	52.5	57.9	44.3	43.3
Air (% vol)	7.7	29.6	22.4	20.1	31.7	33.8	23.6	23.0	22.8

(T : terre, t : tourbe, s : sable, p : perlite)

Fig.8 Caractéristiques des substrats



% du volume

Tab.7 - RESULTATS A J71-

traitements	reprise de croissance (%)	UC71 - UC26	H71 - H26
T0	87.5	1.06 b	1.11 bc
T1	65.6	0.70 c	0.54 e
T2	78.1	1.00 b	0.84 cde
T3	75	0.79 c	0.98 bcd
T4	59.3	0.63 c	0.67 de
T5	71.8	0.74 c	0.59 e
T6	87.5	1.17 b	1.20 b
T7	81.2	1.08 b	1.75 a
T8	93.7	1.39 a	1.98 a

5.3. CONCLUSION

Le mélange Tourbe/Terre (50/50) s'avère très satisfaisant pour l'ensemble du processus d'acclimatation. L'utilisation de la tourbe, produit d'importation, représente cependant une légère contrainte. Il est peut être possible à partir de matériaux d'origine locale de retrouver les mêmes caractéristiques physico-chimiques de notre mélange sélectionné.

6. LE CONTENEUR

La taille et la forme du conteneur jouent un rôle très important sur la croissance aérienne des plantes ligneuses et la structure du système racinaire (1.5.15.25).

Pour les plants forestiers, l'AFOCEL recommande l'utilisation de conteneurs à parois pénétrables aux racines (Melfert, Fertil-pot) permettant d'arrêter la phase de transfert dès que quelques racines percent la paroi (12).

De la sortie de tube jusqu'au transfert en champ des microboutures d'hévéa, il s'écoule une période supérieure ou égale à quatre mois. Nous avons recherché des conteneurs ayant les propriétés suivantes :

- possibilité de tri des microboutures après la phase d'enracinement,
- volume et forme adaptés au système racinaire,
- parois autorisant un cernage aérien des racines,
- matière permettant un planting en champ sans retirer le conteneur.

6.1. LES PLATEAUX D'ENRACINEMENT

Tant que les microboutures d'hévéa reçues sans racine en Côte d'Ivoire n'auront pas un taux d'enracinement constant et élevé (> 85%), l'utilisation de plateaux alvéolés de bouturage en polystyrène (alvéoles de 2.4x2.4x4 cm) sera justifié.

Ces plateaux présentent plusieurs intérêts :

- repiquage des microboutures rapide à la sortie de tube,
- économie de substrat,
- économie de place,
- tri des plantules enracinées après trente jours de confinement.

6.2. LES CONTENEURS D'ELEVAGE

6.2.1. Matériels et méthodes

* Matériel : microboutures d'hévéa, seedling, expédiées de Montpellier sans racine.

* Traitements :

- T0 : sacs polyéthylène de 3l. + terre végétale de surface
- T1 : sacs en toile non tissée P30, 350 ml.+ terre
- T2 : sacs P30, 500 ml. + terre
- T3 : sacs P30, 350 ml. + 80% tourbe et 20% sable
- T4 : sacs P30, 500 ml. + 80% tourbe et 20% sable
- T5 : cover-tube, 500 ml. + " "
- T6 : mottes melfert, 300 ml. + " "

* Conditions expérimentales : l'enracinement est réalisé sur des plateaux alvéolés contenant 80% tourbe + 20% sable. Le rempotage à la fin de la phase d'enracinement correspond au début de l'expérience. Il a lieu 26 jours après la sortie de tube. Le calendrier de l'acclimatation après les 26 j. de confinement est le suivant :

- 30 j. sous tunnels P30, pignons ouverts, sans AQUANAP ni ombrière, sous brumisation continue,
 - 15 j. sous ombrière à 60% avec arrêt de la brumisation et sortie hors des tunnels P30.
- Aucun engrais n'a été apporté au cours de cette expérience. Chaque traitement comprend 35 plants.

6.2.2. Résultats

Les meilleurs accroissements en hauteur et en UC entre J29 et J132 ont été obtenus avec les sacs polyéthylènes de 3l. et les cover-tubes de 500 ml. (Fig.9).

Les taux de reprise de croissance des traitements réalisés avec un substrat composé de 80% tourbe + 20% sable sont supérieurs à 80% quelque soit le type de conteneur utilisé. L'emploi de la terre pure donne au contraire des taux de reprise inférieurs à 75%.

Les plus faibles accroissements (H et UC) obtenus avec les sacs en toile non tissée et les mottes melfert remplis du mélange 80% tourbe + 20% sable, ont les taux de reprise de croissance les plus élevés.

La meilleure combinaison conteneur/substrat de cette expérience est le traitement T5.

6.2.3. Discussion

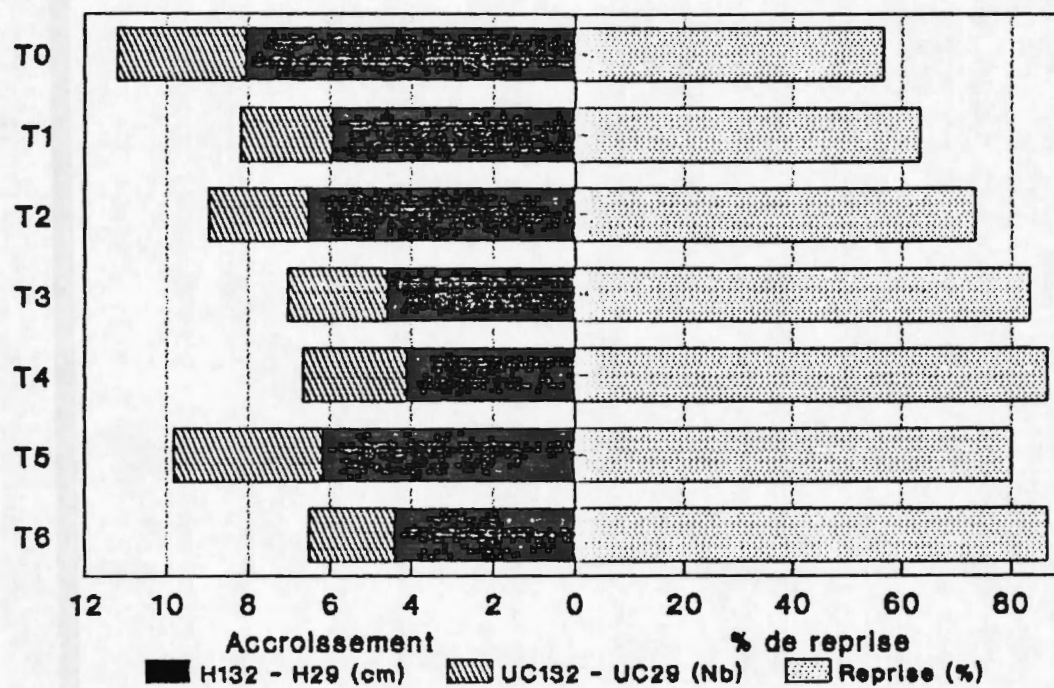
Les résultats ci-dessus sont vraisemblablement liés à la quantité d'eau disponible pour les plants :

- l'évaporation limitée à la surface du substrat à l'air libre dans le cas des sacs polyéthylènes et des cover-tubes, a aussi lieu à travers toutes les faces des conteneurs en toile non tissée et des mottes melfert,
- la tourbe, matériau organique très hydrophobe, s'humidifie plus difficilement que la terre une fois desséchée.

Les taux de reprise de croissance bas enregistrés avec l'utilisation de la terre pure s'expliquent peut être par la porosité très faible de la terre la rendant asphyxiante (37.5% contre 84.9% pour le mélange 80% tourbe + 20% sable, voir chapitre "le substrat" de ce rapport).

Les sacs en toile non tissée présentent de nombreux avantages (rempotage plus facile, économie de place, cernage racinaire aérien, transfert en champ rapide sans retirer le conteneur), mais

Fig.9 Les conteneurs



il est nécessaire d'adapter les techniques d'irrigation ainsi que la composition du substrat.

6.3. CONCLUSION

Il semble important (en raison des multiples avantages que l'on peut en retirer) de poursuivre l'expérimentation sur les sacs en toile non tissée :

- en y incluant d'autres types de toiles (Nordlys par exemple),
- en utilisant une fertilisation adaptée définie par les expériences de nutrition minérale,
- en travaillant également sur l'optimisation de la gestion de l'eau,
- en étudiant le comportement des plants après le passage en champ.

En relation avec l'amélioration des taux d'enracinement et de reprise de croissance, l'objectif à atteindre est d'utiliser un seul type de conteneur depuis la phase d'enracinement jusqu'au planting (suppression de l'opération de repiquage après enracinement).

7. L'APPORT DE CO₂

L'enrichissement de l'atmosphère en CO₂ est une technique de plus en plus utilisée en serres horticoles, en association ou non avec l'éclairage additionnel, pour augmenter le rendement photosynthétique des plantes cultivées (6.10.16.17).

Un dispositif expérimental d'apport en CO₂ a été mis en place pour l'acclimatation des microboutures d'hévéa. Il doit permettre l'étude de plusieurs paramètres :

- les stades morphologiques des microboutures propices à l'apport de CO₂,
- le taux d'enrichissement en CO₂ de l'atmosphère,
- la durée de l'enrichissement.

7.1. APPORT DE 1800 ppm ENTRE J0 ET J42

7.1.1. Matériels et méthodes

* Matériel : microboutures d'hévéa, seedling, expédiées de Montpellier sans racine.

* Traitements :

- T0 : témoin standard absolu, air non enrichi en CO₂
 - T1 : témoin relatif, balayage d'air non enrichi en CO₂
 - T2 : enrichissement de l'air en CO₂ à un taux de 1800 ppm.
- Il y a 40 plants par traitement.

* Conditions expérimentales :

- Abri : tunnels de 250 l. couverts d'une toile de plastique transparent et d'une toile P30 brumisée en continu au cours de la journée
- Conteneur : cover-tubes de 500 ml.
- Substrat : 80% tourbe + 20% sable
- Lumière : ombrage à 60% au dessus des tunnels
- Nombre de renouvellement de l'atmosphère d'un tunnel : 4/h.
- Apport de CO₂ : entre 7.30 h. et 17 h.
- Dosage du CO₂ : méthode gravimétrique à l'hydroxyde de baryum

7.1.2. Résultats

L'apport de 1800 ppm de CO₂ (six fois la concentration en CO₂ de l'air atmosphérique) pendant 42 jours après la sortie de tube a donné les meilleurs résultats vis à vis de la hauteur des plantules et surtout de la précocité de l'enracinement (Tab.8).

7.2. APPORT DE 1800 ppm ENTRE J42 ET J72

7.2.1. Matériels et méthodes

Le matériel et les traitements (T0,T1,T2) sont identiques à ceux de l'expérience précédente.

Les conditions expérimentales restent inchangées, mais un apport d'engrais est effectué (PLANTPROD 20-20-20, 1 g./l. 25ml/plant, deux fois par semaine).

7.2.2. Résultats

Cette expérience a été réalisée deux fois.

* Expérience 1 : les résultats révèlent pour le traitement T2 une nette amélioration des taux de reprise de croissance, une stimulation de la croissance du système racinaire et de la tige accompagnée d'une augmentation très importante de leur poids sec (Tab.9 et Fig.10).

* Expérience 2 : une confirmation des résultats précédents est apportée au niveau du système aérien (gain de croissance en hauteur et en nombre d'unités de croissance), mais les systèmes racinaires des trois traitements sont peu différents (Tab.10).

Notons aussi que les feuilles de T2 sont les seules à présenter une coloration jaune inhabituelle.

7.3. CONCLUSION

L'apport de CO₂ semble bénéfique pour l'acclimatation des microboutures d'hévéa, mais il est nécessaire :

- de revoir les expériences précédentes avec un taux d'enrichissement en CO₂ plus bas,
- d'étudier le fonctionnement des stomates et les processus de différenciation tissulaire,
- de calculer le seuil de rentabilité d'un apport de CO₂ réalisé à grande échelle.

Tableau 8 Apport de 1800 ppm entre J0 et J42

	% de plants enracinés		Accroissement (J42-J0)	
	J16	J28	H (cm)	nb d'UC
T0	33.3	64.1	0.31 b	0.49 a
T1	58.9	58.9	0.41 ab	0.54 a
T2	71.7	76.9	0.49 a	0.48 a

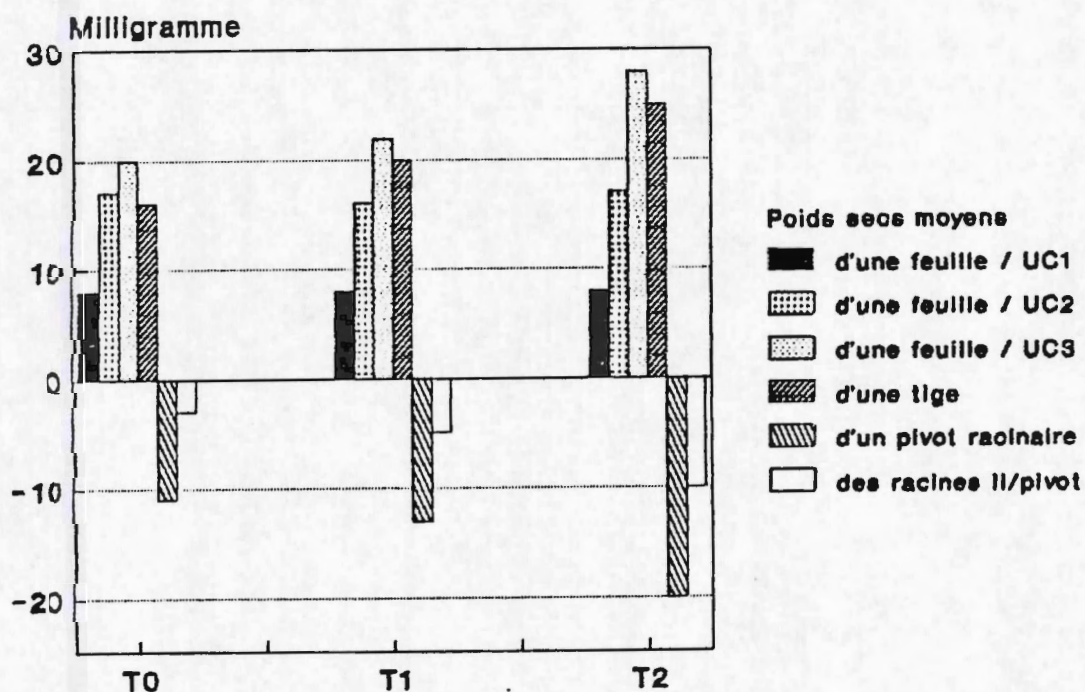
Tableau 9 Apport de 1800 ppm entre J42 et J72 (exp.1)

		T0	T1	T2
Taux (%)	de survie	70	85	87.5
	de reprise	67.5	77.5	87.5
Accroissement (J72 - J42)	en centimètre	1.08 ab	1.02 b	1.29 a
	en Nb d'U.C.	1.31 a	1.23 a	1.28 a
Poids secs moyens (mg.)	d'1 tige	16 c	20 b	25 a
	d'1 feuille/UC1	8 a	8 a	8 a
	d'1 feuille/UC2	17 a	16 a	17 a
	d'1 feuille/UC3	20 a	22 a	28 a
	d'1 pivot	11 b	13 b	20 a
	des racines II	3 b	5 b	10 a

Tableau 10 Apport de 1800 ppm entre J42 et J72 (exp. 2)

		T0	T1	T2
Taux de survie (%) à J72		90.0	80.0	100
Accroissement (J72-J42)	en nb d'UC	0.57 b	0.54 b	0.71 a
	en H (cm)	0.60 b	0.66 b	0.96 a
Poids secs (mg)	d'1 tige	26.13 b	27.06 ab	29.13 a
	d'1 feuille/UC3	16.06 a	22.43 a	24.60 a
	d'1 pivot	9.26 a	10.96 a	11.56 a
	des racines II	4.36 ab	3.83 b	6.83 a

Fig.10 Apport de CO₂
Résultats à J72



8. CONCLUSION

Le triple objectif fixé en 1988 correspondait à la mise au point d'une technique d'acclimatation qui soit à la fois :

- adaptée à du matériel végétal issu de cultures indéfinies,
- reproductible à l'extérieur de l'IRCA - Côte d'Ivoire,
- transposable à grande échelle.

Ces trois points ont fait l'objet de plusieurs expériences nous conduisant vers un nouveau schéma d'acclimatation composé de quatre phases ayant chacune une durée d'environ un mois (voir fiche technique et Fig.11): enracinement, reprise de croissance, endurcissement et élevage.

La réduction de la période totale d'acclimatation avant le transfert en champ (4 mois actuellement au lieu de 10 en 1988), la diminution du volume des conteneurs (350 ml. au lieu de 7 l.), l'utilisation d'un substrat unique, ainsi que la réception de microboutures non enracinées ont contribué à simplifier la méthode d'acclimatation. Le calendrier des travaux s'est allégé et la capacité d'accueil a été multipliée par 10 sans agrandir la surface d'acclimatation (l'IRCA de Bimbresso peut aujourd'hui accueillir et acclimater 5000 microboutures par mois).

L'optimisation des techniques de cultures classiques (nutrition minérale, composition du substrat, éclairage) ainsi que les innovations apportées au procédé (enracinement ex-vitro, cernage racinaire aérien, apport de CO₂), ont permis d'améliorer les caractères morphologiques et physiologiques des microboutures acclimatées.

Les problèmes restant à résoudre concernent le rajeunissement des clones (IRCA 18, PB235...) et la phase de conditionnement avant l'enracinement : ces problèmes sont imputables au processus de micropropagation in-vitro.

Le conditionnement des microboutures en particulier devrait permettre une meilleure réussite de l'enracinement, phase qui apparaît être le principal facteur limitant de notre méthode d'acclimatation (Fig. 12).

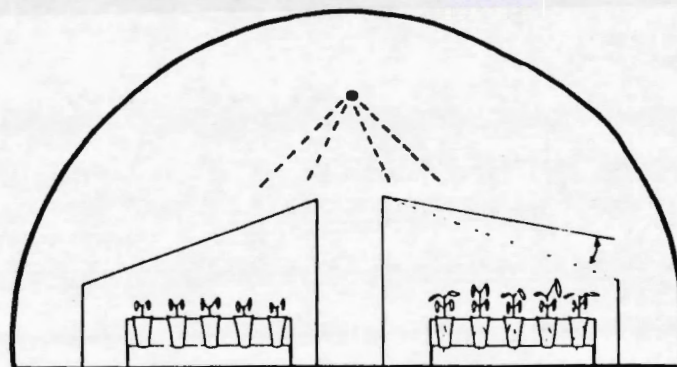
Les résultats exposés dans ce rapport proviennent tous d'expériences à courtes durées mises en place avec un nombre restreint de microboutures-seedling. Avant de passer du stade expérimental à un stade industriel avec du matériel végétal cloné, des essais préliminaires sont sans doute à réaliser.

Fig. 11

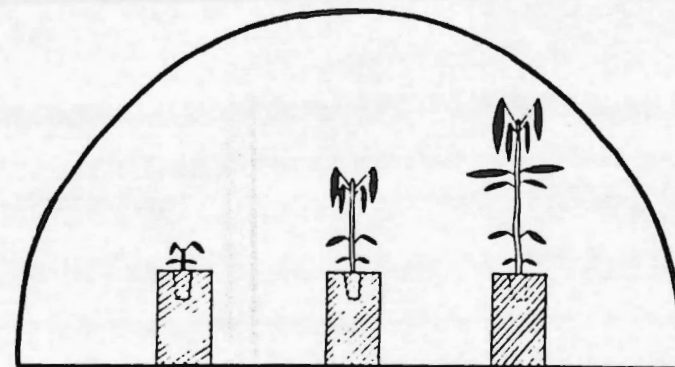
SCHEMA D'ACCLIMATATION

Comparaison 1988-1990

1
9
8
8

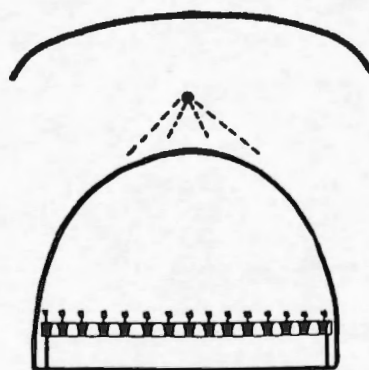
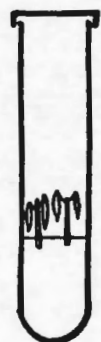


SEVRAGE
(28 j)

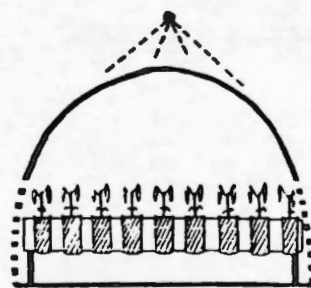


FORCAGE
(60 j)

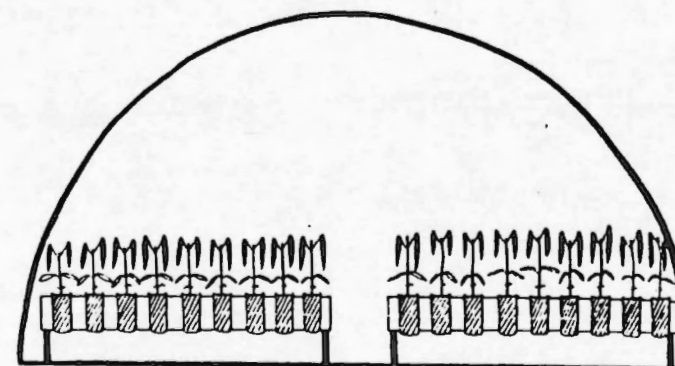
1
9
9
0



ENRACINEMENT
(28 j)

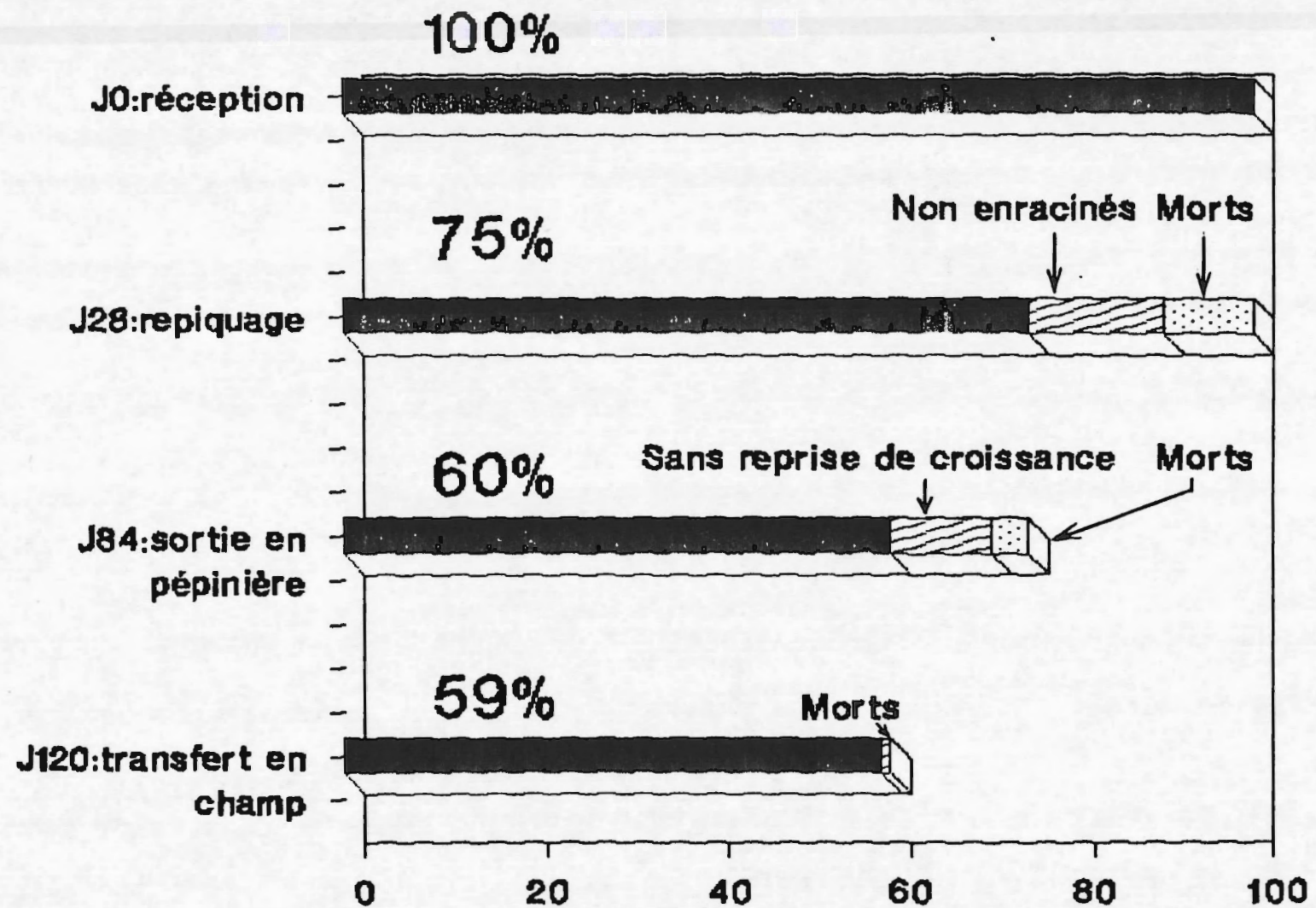


**REPRISE de
CROISSANCE**
(28 j)



ENDURCISSEMENT
(28 j)

Fig.12 TAUX DE REUSSITE DE L'ACCLIMATATION (Seedlings)



9. BIBLIOGRAPHIE

1. BIRAN I., ELIASSAF A., 1980
The effect of container size and aeration conditions on growth of roots and canopy of woody plants
Scientia Hort., 12: 385-394.
2. BOXUS P., 1987
L'acclimatation des arbres fruitiers. Symposium Florizel 1987. Arlon, Belgique, in Plant micropropagation in horticultural industries, DUCATE G., JACOB M., SIMEON A. (Eds) : 108-111.
3. BRAINERD K.E., FUCHIGAMI L.H., 1982
Stomatal functioning of in vitro and greenhouse apple leaves in darkness, mannitol, ABA, and CO₂. *J. Exp. Bot.*, 33 (134) : 388-392.
4. BRAINERD K.E., FUCHIGAMI L.H., KWIATKOWSKI S., CLARK C.S., 1981
Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured "Pixy" plum grown under different environments. *Hortscience*, 16 (2) : 173-175.
5. CARMI A., SHALHEVET J., 1983
Root effects on cotton growth and yield.
Crop Sci., 23 : 875-878.
6. CONROY J.P., KUPPERS M., KUPPERS B., VIRGONA J., BARLOW E.W.R., 1988
The influence of CO₂ enrichment, phosphorus deficiency and water stress on the growth, conductance and water use of Pinus radiata D. Don. *Plant, Cell and Envir.*, 11 : 91-98.
7. DEBERGH P.C., MAENE L.J., 1981
A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissues culture.
Scientia Horticulturae, 14 : 335-345.
8. DONNAN A., DAVIDSON S.E., WILLIAMS C.L., 1978
Establishment of tissue culture grown plants in the green house environment.
Proc. Fla. State Hort. Soc., 91 : 235-237.
9. DONNELLY D.J., VIDAVER W.E., LEE K.Y., 1985
The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil.
Plant Cell Tissue Organ Culture, 4 : 43-50.
10. DOWNTON W.J.S., GRANT W.J.R., LOVEYS B.R., 1987
Carbon dioxide enrichment increases yield of Valencia orange.
Aust. J. Plant. Physiol., 14 : 493-501.
11. FONCELLE B., MATEILLE T., 1987
Production de vitroplants de bananiers Musa AAA cv. "Poyo" en Côte d'Ivoire. Symposium Florizel 1987, Arlon, Belgique, in Plant micropropagation in horticultural industries, DUCATE G., JACOB M., SIMEON A. (Eds) : 213-217.

12. FRANCKET A., 1987
Plant micropagation in horticultural industries : preparation, hardening and acclimatization processes. Symposium Florizel 1987, Arlon, Belgique, in Plant micropagation in horticultural industries, DUCATE G., JACOB M., SIMEON A. (Eds) : 23-40.
13. GROUT B.W.W., ASTON M.J., 1977
Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I : water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration.
Hort. Res., 17 : 1-7.
14. GUERRIER G., VIEMONT J.D., BEAUJARD F., 1985
Influence de la concentration de la solution nutritive dans la phase de réinsertion in vivo des vitroplants d'Erica x dalecyensis.
I : Développement et contenu minéral des vitroplants transférés.
Plant and Soil, 84 : 323-335.
15. HANSON P.J., DIXON R.K., DICKSON R.E., 1987
Effect of container size and shape on the growth of Northern red oak seedlings.
Hortscience, 22 (6) : 1293-1295.
16. HURD R.G., 1968
Effects of CO₂-enrichment on the growth of young tomato plants in low light.
Ann. Bot., 32, 531-542.
17. HURD R.G., THORNLEY J.H.M., 1974
An analysis of the growth of young tomato plants in water culture at different light integrals and CO₂ concentrations. I : physiological aspects.
Ann. Bot., 38 : 375-388.
18. LEE N., WETZSTEIN H.Y., SOMMER H.E., 1985
Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultra-structure in tissue-cultured plantlets and seedlings of Liquidambar styraciflua L. towards improved acclimatization and field survival.
Plant. Physiol., 78 : 637-641.
19. MAENE L.J., DEBERGH P.C., 1987
Optimalisation of the transfer of tissue cultured shoots to in vivo conditions.
Acta Horticulturae, 212 : 335-348.
20. MARIN J.A., GELLA R., HERRERO M., 1988
Stomatal structure and functioning as a response to environmental changes in acclimatized micropropagated Prunus cerasus L. Annals of Botany, 62 : 663-670.
21. NILEE, WETZSTEIN H.Y., 1988
Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of in vitro - and in vivo - developed sweetgum leaves.
J. Amer. Soc. Hort. Sci. 113 (1) : 167-171.

22. RAHMAN M.A., 1989
Effects of nutrients on the growth and survival of in vitro Artocarpus heterophyllus Lam plantlets after transfer to ex vitro conditions in the glasshouse.
J. Hort. Sci., 63 (2) : 329-355.
23. SCHALL S., 1987
La multiplication de l'avocatier (Persea americana Mill. cv. Huerte) par microbouturage in vitro.
Fruits, 42 (3) : 171- 176.
24. SOMMER H.E., WETZSTEIN H.Y., MERKLE S.A., 1987
Application of tissue culture techniques of forest trees. in Improving vegetatively propagated crops, ABBOTT A.J., ATKIN R.K. (Eds), Academic Press, London, England : 365-383.
25. TSCHAPLINSKI T.J., BLAKE T.J., 1985
Effects of root restriction on growth correlations, water relations and senescence of alder seedlings.
Physiol. Plant., 64 : 167-176.
26. WETZSTEIN H.Y., SOMMER H.E., 1982
Leaf anatomy of tissue-cultured Liquidambar styraciflua (Hamamelidaceae) during acclimatization.
Amer. J. Bot., 69 (10) : 1579-1586.

FICHE TECHNIQUE

L'acclimatation des microboutures d'hévéa (seedling) non enracinées (mais induites à l'enracinement in-vitro) se décompose en quatre phases ayant chacune une durée d'environ un mois :

- enracinement : apparition du (ou des) futur pivot racinaire
- reprise de croissance : émission de la première unité de croissance in-vivo
- endurcissement : élimination progressive des protections climatiques
- élevage : croissance jusqu'à un stade compatible avec le passage en champ

Les différentes opérations à effectuer sont :

- aménagement de la surface d'acclimatation
- sortie de tube et repiquage
- traitement fongicide
- rempotage
- fertilisation et arrosage
- espacement des sacs

10.1. AMENAGEMENT DE LA SURFACE D'ACCLIMATATION

10.1.1. Partie enracinement

- * Ombrage : 60% (toile brise-vent NORTENE)
- * Abri : tunnels en toile P30 fermés (armature en tubes PVC)
- * Brumisation : au dessus des tunnels, intermittente (3x10 min/h.)
- * Nappe d'arrosage : AQUANAP imbibée d'eau
- * Désinfection du P30 et de l'AQUANAP : solution d'HORTISEPTYL à 1% une fois par mois

10.1.2. Partie reprise de croissance

- * Ombrage : supprimé
- * Abri : tunnels P30 ouverts aux extrémités
- * Brumisation : au dessus des tunnels, continue
- * Nappe d'arrosage : supprimée
- * Désinfection du P30 : HORTISEPTYL 1%/mois

10.1.3. Partie endurcissement

- * Ombrage : 60% (brise-vent NORTENE)
- * Abri : supprimé
- * Brumisation : au dessus des plants, manuelle puis supprimée

10.1.4. Partie élevage

- * Ombrage : 60%, rapidement retiré au bout d'une semaine
- * Abri : enclos grillagé
- * Dispositif d'accueil en "pilotis" pour le cernage racinaire aérien des plants

10.2. SORTIE DE TUBE ET REPIQUAGE

La sortie de tube et le repiquage ont lieu à proximité de la partie enracinement de la surface d'acclimatation, en plein air, à l'ombre, et avec une brumisation intermittente par période d'harmattan.

Ces opérations doivent être réalisées de préférence en début de matinée (humidité relative ambiante élevée).

10.2.1. Substrat

- * Terre : 50%
- * Tourbe blonde FLORA : 50%
- * Fongicide : FONGARIDE, 200 g./m³ de mélange final

10.2.2. Conteneur

Utilisation de plateaux alvéolés de bouturage (alvéoles de 2.4x2.4x4 cm) en polystyrène. Le remplissage des plateaux doit être réalisé avec soin, le substrat devant être tassé uniformément sans excès. Les plateaux après chaque utilisation doivent être désinfectés avec une solution d'HORTISEPTYL à 1%.

10.2.3. Description des opérations

Une personne ouvre les tubes, retire les microboutures à l'aide d'une pince, les rince sous un jet d'eau (afin d'éliminer la gélose) et les trempe quelques minutes dans une solution de fongicide (BENLATE 1g./l.)

Une ou deux autres personnes repiquent les plantules dans les alvéoles remplies de substrat et les disposent sous les tunnels de confinement. Les plateaux alvéolés ne doivent pas directement reposer sur l'AQUANAP.

Trois personnes repiquent et étiquettent 1000 microboutures en 2h.

10.3. TRAITEMENT FONGICIDE

Après installation des plantules dans les tunnels d'enracinement, pulvériser une solution de BENLATE 1g/l. sur les feuilles avant la fermeture de la toile P30.

Pendant toute la durée de l'acclimatation (les quatre phases), une pulvérisation foliaire de BENLATE 1g/l. est conseillée tous les 15 jours.

10.4. REMPOTAGE

Après la phase d'enracinement, les microboutures sont repotées dans un conteneur qui durera jusqu'au passage en champ (et qui ne sera pas retiré au moment du planting).

10.4.1. Substrat

- * Tourbe blonde FLORA : 50%
- * Terre végétale de surface : 50%
- * Fongicide : FONGARIDE, 200g./m³ de mélange final

10.4.2. Conteneur

- * Sacs de 350 ml. en toile de fibres synthétiques non tissées
- * Disposition des sacs sur des caisses melfert 60 emplacements
- * Le remplissage des sacs doit être réalisé avec soin, le substrat devant être tassé uniformément (sans excès) sur toute la hauteur du sac (éviter les poches d'air)

10.4.3. Description des opérations

Les microboutures enracinées sont dégagées de leur alvéole à l'aide d'une spatule. Lorsque le substrat a été préalablement bien tassé, il y a formation de petites mottes moulées dans les alvéoles. Une personne repote 120 plants à l'heure.

10.5. FERTILISATION ET ARROSAGE

A partir du repotage en sacs de 350 ml. : apporter deux fois par semaine une solution de PLANTPROD 20-20-20, 1g/l. à raison de 25ml/plant. Cette fertilisation doit être poursuivie jusqu'au transfert en champ.

En plus des apports d'engrais, compte tenu de la déshydratation du substrat, les arrosages à l'eau sont nécessaires. Une surveillance constante de l'état hydrique du substrat est donc à cet égard indispensable.

10.6. ESPACEMENT DES SACS

Il a lieu au moment du passage des plants de la partie endurcissement à la partie élevage. C'est de cet espacement (30 plants par caisse melfert au lieu de 60) et du dispositif en 'pilotis' destiné à recevoir les caisses, que dépend la réussite du cernage aérien des racines.

Méthode de calcul de la "DENSITE REELLE" d'un sol

Dans une fiole de 50 ml tarée auparavant (soit Pa son poids),
mettre un poids de terre fine séchée à l'air d'environ 20 g Peser :
soit Ps.

Remplir la moitié de la fiole avec de l'eau distillée et faire
bouillir doucement environ 30 minutes.

Refroidir - Ajuster avec de l'eau distillée bouillie.

Prendre la température - Peser :
soit Psw.

Peser la fiole pleine d'eau à la même température :
soit Pw.

Soit dw la densité d'eau en g/cm³ à la température considérée.
La densité réelle est alors :

$$D_p = \frac{dw (P_s - P_a)}{(P_s - P_a) - (P_{ws} - P_w)}$$

TABEAU DE dw EN FONCTION DE LA TEMPERATURE :

0° C	dw
16° C	0,9989
17° C	0,9988
18° C	0,9986
19° C	0,9984
20° C	0,9982
21° C	0,9980
22° C	0,9978
23° C	0,9976
24° C	0,9973
25° C	0,9971